

⑩ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公表特許公報 (A)

⑪ 特許出願公表
昭58—502205

④ Int. Cl.³
C 07 H 21/04
G 01 N 33/50

識別記号

庁内整理番号
7252—4C
8305—2G

⑬ 公表 昭和58年(1983)12月22日

部門(区分) 3(2)
審査請求 未請求
予備審査請求 未請求
(全 7 頁)

⑭ 末端の少くとも1つが関連分子により認識可能な被修飾
リボヌクレオチドで標識されたDNA断片及び前記の如
きDNA断片の解析方法

① 特 願 昭58—500211
② 出 願 昭57(1982)12月29日
③ 翻訳文提出日 昭58(1983)8月26日
④ 国際出願 PCT/FR82/00223
⑤ 国際公開番号 WO 83/02277
⑥ 国際公開日 昭58(1983)7月7日
優先権主張 ⑦ 1981年12月29日 ⑧ フランス(FR)
⑨ 81/24443
⑩ 発 明 者 クーリススキー・フィリップ
フランス国75015パリ・リュ・ドウ・ヴ

⑪ 発 明 者 オジラル207
ヴァンサン・クリスチャン
フランス国75015パリ・リュ・ドウ・ア
モー24
⑫ 発 明 者 チアン・ポール
フランス国92000ナンテール・リュ・ド
ユ・テレグラフ18
⑬ 出 願 人 アンステイテユ・バストゥール
フランス国75015パリ・リュ・ドウ・ド
クトゥール・ルー28
⑭ 代 理 人 弁理士 川口義雄 外1名
⑮ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH
(広域特許), DE(広域特許), GB(広域
特許), JP, NL(広域特許), US

要 求 の 範 囲

1. 末端の少くとも一方に結合された被修飾リボヌクレオチド
オリゴマー好ましくは唯一つの被修飾リボヌクレオチドによ
つて修飾されたDNAであり、リボヌクレオチド自体の修飾
が、前記リボヌクレオチドに共有結合的に結合した化学分子か
ら成り、前記化学分子は前記共有結合に参加しない基を少く
とも1つ含んでおり、前記基は、前記基に特異的な親和力を
有しており前記基を認識し得る分子又は物質と直接又は間接
に結合可能であり、前記基が更に、DNAの末端に1つ以上
のリボヌクレオチドが結合し得る条件下でリボヌクレオチド
がDNAと接触したときにターミナルDNAトランスフェラ
ーゼの存在中で前記基を含むリボヌクレオチドがDNAの末
端に結合されるのを妨害しないものであるような被修飾DNA。
2. 前記修飾基は、それ自体が視覚的方法で容易に検出され得
る別の分子又は物質によつて直接に特異的に認識され得るこ
とを特徴とする請求の範囲1に記載の被修飾DNA。
3. 前記修飾基が抗原又はヘプテンから成り、前記抗原又はヘ
プテンは各々に対して予め形成された抗体によつて認識され
得ることを特徴とする請求の範囲2に記載の被修飾DNA。

4. 前記修飾基が別の分子又は別の物質に対する中継体の機能
を果たしており、前記別の分子又は別の物質自体が可視化され
得ることを特徴とする請求の範囲1に記載の被修飾DNA。
5. 前記修飾基又は場合により前記中継分子が、標識により検
識された関連分子と化学的に結合し得るか、又は、標識によ
つて標識されており前記修飾基又は前記中継分子に対する選
択的親和力を有する抗体と免疫学的に結合し得ることを特徴
とする請求の範囲1乃至4のいずれかに記載の被修飾DNA。
6. 末端の少くとも1つに少くとも1つの被修飾リボヌクレ
オチド基が結合された被修飾DNAに於いて前記被修飾リボ
ヌクレオチド基が、アデニン基の6位好ましくは8位に共有結
合的に結合された修飾基によつて修飾されたATPから誘導
されており、前記修飾基の結合は式

$$-NH-(CH_2)_x-X \text{ 又は } -CO-(CH_2)_x-X$$
で示されるタイプのリンクを介して行なわれており、式中の
xは2乃至20好ましくは6乃至12、Xは、当該基に対す
る選択的親和力を有する化学的又は免疫学的薬品との結合反
応が可能な基のうちから選択された基Mとの結合を確保する
基であることを特徴とする請求の範囲1乃至5のいずれかに
記載の被修飾DNA。

7. 前記リンクの基CH₂は、置換基が等しい基に隣接しないという必要条件下で基CO又はNHによつて部分置換され得ることを特徴とする請求の範囲6に記載の被修飾DNA。
8. 前記修飾基が、ピオチン、アビジンから誘導された基、又は2,4-ジニトロフェニル基を含むことを特徴とする請求の範囲1乃至7のいずれかに記載の被修飾DNA。
9. 請求の範囲1乃至8のいずれかに記載の如き修飾基を任意に担持する当該リボヌクレオチドとDNA中で通常は対合し得るリボヌクレオチドを少なくとも存在させ且つ必要場合はターミナルDNAトランスフェラーゼを存在させ請求の範囲1乃至8のいずれかに記載の如き修飾基を担持するリボヌクレオチドで前記DNAを処理し、処理後に得られたDNAの末端の結合物質が被修飾ヌクレオチドオリゴマーから成るときは、当該DNA末端のターミナルデオキシリボヌクレオチドに直接結合したリボヌクレオチド以外の前記位置^(にわたり)よりオリゴマーの被修飾リボヌクレオチドを除去し、この除去が好ましくは、前記オリゴマー断片中のリボヌクレオチド間に互いに形成された結合を分離し得る条件下でアルカリ性塩基特に水酸化ナトリウムを用いて行なわれるステップを含むDNAの修飾方法。

明 細 書

末端の少なくとも1つが関連分子により認識可能な被修飾リボヌクレオチドで標識されたDNA断片及び前記の如きDNA断片の解析方法

本発明は、末端の少なくとも1つが被修飾ヌクレオチド断片、より詳細には関連分子により認識可能な被修飾リボヌクレオチド断片で標識されたDNA断片、及び前記の如き断片の配列解析方法に係る。

DNAに含まれるヌクレオチド配列の解析技術として先ず、所謂MAXAM & GILBERTの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、74巻、第2号、560乃至564ページ、1977年2月)を挙げることができる。該方法に於いては、解析すべきDNAに対してグアニン塩基及びアデニン塩基の処で異なる程度の開裂、シトシン塩基及びチミン塩基の処で等しい程度の開裂、最後にシトシン塩基の処でのみ開裂が生じるような開裂反応が生起される。しかし乍ら該方法では、被検DNAの末端の1つを放射能マーカー特に³²Pで予め標識しておく必要がある。これにより、前記の如き開裂処理後に得られた断片が特にポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離された後、被検DNAを最初に構成していた種々のヌクレオチドの順次配

10. 請求の範囲1乃至8のいずれかに記載の如き修飾基を~~担持~~れかに記載の如き修飾基を担持するリボヌクレオチドによるDNAの末端の1つの修飾を利用し、対応する制限酵素の作用と、全てが末端の1つに同じ被修飾リボヌクレオチドを担持する得られた断片の回収、分画及びサイズ比較とによつて前記DNAの制限マップが得られるDNAの修飾の適用。
11. 請求の範囲1乃至8のいずれかに記載の如き修飾基を含むリボヌクレオチドによるDNAの末端の1つの修飾を利用してDNA構成ヌクレオチドの配列を解析するために、前記DNA内部である種の塩基のレベルで差異開裂を生起し得る化学薬品で前記DNAを処理し、サイズに基づいてDNA断片を分画し得る系でDNA断片を収集分離し、ターミナルリボヌクレオチドを担持する断片のターミナルリボヌクレオチドにより担持された化学基と前記ターミナルリボヌクレオチドの修飾化学基に対して選択的親和力を有する分子又は物質とを結合させ得る試薬によつて前記DNA断片を反応させて可視化し、各DNA断片のレベルでの開裂に使用された化学薬品の性質を考慮して各DNA断片の非修飾ターミナルヌクレオチドを決定するステップを含む方法から成るDNAの修飾の適用。

列の標識を復元することが可能になる。このような復元は特に、ゲルに密着させた感光性フィルムに形成され得るオートラジオグラフ像に基いて行なわれる。

ゲルプレート上の開裂産物のオートラジオグラフ検出が種技術であることはよく知られている。標識同位元素の放射線が空間の全方向に拡散するため、ゲル内の種々の泳動バンドについて十分な解像度を得るには超薄プレートを使用する必要がある。一般に該プレートの厚みは0.3mmを越えない。ゲルプレートの厚みが増すとオートラジオグラフ法の分解能は急激に低下するであらう。また、放射線の使用自体にも危険が伴わないとは言えない。

本発明の目的は、前記の欠点を除去し、特に、研究対象とする配列を有するDNAの修飾方法を提供し、これにより、配列解析プロセスに於て得られたDNA断片のその後の検出を容易にすることである。(配列解析プロセスとして検出の方法又は同様の結果に到達し得る他の任意の方法が使用され得る。)

本発明の被修飾DNAの特徴は、被修飾リボヌクレオチドオリゴマー好ましくは唯一の被修飾リボヌクレオチドがDNAの末端の少なくとも1つに結合されており、リボヌクレオチド自体の修飾は該リボヌクレオチドに共有結合的に^(直接)結合された化学

分子によつて行なわれており、該化学分子が該配共有結合に参加しない少くとも1つの基を有しており、該基は、この基に特異的な親和力を有しており従つて被修飾DNAを選択的に認識し得る分子又は物質と直接又は間接的に結合し得ることである。

特に、該配基は、それ自体が直接検出可能であるか又は別の検出可能物質との結合によつて検出可能になり得る分子又は物質と化学的又は免疫学的に親和性結合（関連結合、*linkage*）することができる。更に、前記基は、DNA末端に1つ以上のリボヌクレオチドが結合できる条件下でDNAとリボヌクレオチドが接触したときに、ターミナルDNAトランスフェラーゼの存在中でのDNA末端に対するリボヌクレオチドの結合能力を変化させないようなものである。

本発明は更に、前記の如き被修飾DNAを得るための方法に係る。本発明方法によれば、被検DNAが前記の如き被修飾リボヌクレオチドで処置される。この処置は、前記の如き修飾基を任意に担持するリボヌクレオチドとDNA中で通常は対合し得るリボヌクレオチドを少くとも存在させ且つ必要な場合はターミナルDNAトランスフェラーゼを存在させて行なわれる。この処置後に得られたDNAの末端の結合物質が被修飾ヌクレオチドオリゴマーから成るときは前記DNAの末端がター

ミナルデオキシリボヌクレオチドに直接結合したリボヌクレオチド以外の前記の⁽²⁸⁻³⁰⁾場合オリゴマーの被修飾リボヌクレオチドを除去する。この除去は好ましくは、前記オリゴマー断片中のリボヌクレオチド間に形成された結合を分離し得る条件下でアルカリ性塩基特に水酸化ナトリウムを用いて行なわれる。

前記の如くそれ自体が修飾されたりボヌクレオチドを両端に担持するDNAから（又は1端に担持するDNAから）それ自体公知の方法でより小さいDNA断片を得ることができる。このためには、特に所定ヌクレオチドのレベルで開裂を生じ得る化学薬品を作用させるか、又は、より好ましくはエンドヌクレアーゼ特に適当な制限酵素を作用させる。但しこの場合、対応するDNAが対応する制限部位を含んでいる必要がある。

前記のDNA断片を複数の制限酵素で処理し、同一末端が認識された種々の断片を回収して前記DNAの制限マップを作成することが可能である。

所与の制限酵素に唯一つの制限部位が対応するとき、前記DNA断片を該酵素で処置すると所定長の断片が得られる。この断片は、該断片を構成するデオキシリボヌクレオチドの配列解析に使用され得る。

前記の如き配列解析は本発明の好ましい用途の1つである。

本発明の配列解析プロセスは、前記の如く修飾されたリボヌクレオチドで末端の1つが前記の如く認識されたDNAを、DNA中の成る種の塩基特に前出のMAXAM & GILBERTの論文に記載された塩基のレベルで差異開裂を生じ得る化学薬品で処理し、DNA断片をサイズに基づいて分離し得る系に於いてDNA断片を収集分離し、これらの断片のうちのターミナルリボヌクレオチドを有する断片のターミナルリボヌクレオチドによつて担持された修飾化学基と該化学基に対して選択的親和力を有する分子又は物質とを結合せしめる試薬を前記DNA断片と反応させるステップを含む。

前記DNAの末端に結合される被修飾リボヌクレオチドは主として以下の物質から誘導される。

- アデノシン-γ-リン酸 (ATP)。
- グアノシン-γ-リン酸 (GTP)。
- シチジン-γ-リン酸 (CTP) 及び
- ウリジン-γ-リン酸 (UTP)。

上記のリボヌクレオチドに共有結合的に結合し得る化学基は種々の形状を有し得る。但し、該化学基は、検出好ましくは肉眼による検出ができるような親和性物質と結合し得る基を有するものであること、及び、得られた被修飾リボヌクレオチドと

DNA末端との結合を確保するターミナルDNAトランスフェラーゼの作用を妨害しないものであることが要求される。

前記リボヌクレオチドの塩基に結合され得る好ましい化学基としては、それ自体が容易に検出好ましくは視覚的な方法で検出され得る他の分子又は物質によつて特異的に認識され得るいかなる基が選択されてもよい。

前記の如き他の分子又は他の物質は、例えば基質に対して作用を与えることができ該作用によつて存在が検出され得る酵素から成る。基質としては、着色もしくはは脱色反応を生じるもの、又はより広汎には、比色法もしくは分光分析法の各々により検出可能な吸収スペクトルの変化を生じるものが好ましい。ケイ光反応、光学濃度変化等を生じる分子又は物質、例えばアミノフルオレン、塩化ダンシル、ローダミン等から誘導された基を含む物質の使用も勿論可能である。

適当な修飾基としては、別のタイプの化学分子に親和力を有することが判明している化学基が使用され得る。これらの修飾化学基として例えばビオチン又はアビジンがある。これらの分子は相互的親和力を有することが判明しており、一方の分子から誘導された基は選択リボヌクレオチドを修飾する機能を果し、他方の分子は酵素で認識された試薬と結合するか又は酵素に結

合され得る。この際、例えば1978年4月13日出願の
INSTITUT PASTEURのフランス特許出願第78
10975号に記載の条件が用いられる。前記の試薬は例えば、
修飾基に特異的な抗体又は修飾基に特異的な親和力を有する分子
から成る。

出発リボヌクレオチドの有用な修飾基として更に、抗原又は
ヘプテンが挙げられる。これらの抗原又はヘプテンは、特に血
清アルブミン又はポリペプチド例えばポリリシンの如き高分子
キャリアに予め結合されたとき、該抗原又はヘプテンに対して予
め形成された抗体によつて認識され得る。これらの抗原又はヘ
プテンとして、ビオチン及びアビジン自体、アセチルアミノフ
ルオレン誘、ペプチド、ホルモン又はプロスタグランジン、特
に特異的な抗体又は抗体に対応するプロスタグランジン、レク
チンがある。レクチンについては、レクチンを検出可能にする
酵素特にペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ等に対する
結合能力を有することが判明している。前記の如き血清又は抗
体は市販されている。

しかし乍ら場合によつては、前記修飾基に対する親和性を有
する分子又は物質が、特に前記条件下でそれ自体が可視化され
得る別の分子又は別の物質に対する中継体の機能のみを果たして

特表昭58-502205(4)

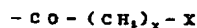
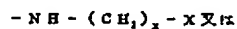
もよい。例えば、前記修飾基に対する親和性を有する物質は、
それ自体認識されていないが対応する抗体によつて認識可能な
抗体から成る。該対応する抗体自体は、免疫薬理学的的定量に關
する従来の条件下で特異的な基質に作用し得る酵素に結合され得
る。

概して、リボヌクレオチドの修飾基は、リボヌクレオチドに
結合することができその後前記条件下で検出することができる
いかなる化学分子又は化学物質でもよいが、DNA-ターミナ
ルトランスフェラーゼの作用下でDNAの末端に結合する^{（1）}修
飾ヌクレオチドの能力を妨害しないものでなければならない。
この特性はまた、認識テストの基盤でもある。即ち認識テスト
に於いては被検出分子又は物質が修飾されたリボヌクレオチド
を末端の少くとも1つに保持する所定DNA断片が、特に前記
条件下で固定化即ち実質的に可視化され得る。但し、このとき
の形質転換DNAは、未修飾の同一リボヌクレオチド又はポリ
ヌクレオチドのオリゴマーを該DNA断片の末端の少くとも
1つに正常に結合せしめる条件下で、DNA-ターミナルト
ランスフェラーゼの存在下で対応するDNA断片と被修飾リボ
ヌクレオチドとが反応して形成されたものでなければならない。

出発リボヌクレオチドがATPから成る場合、前記修飾化学

基はアデニン基の6位好ましくは8位に結合される。

前記結合は、式

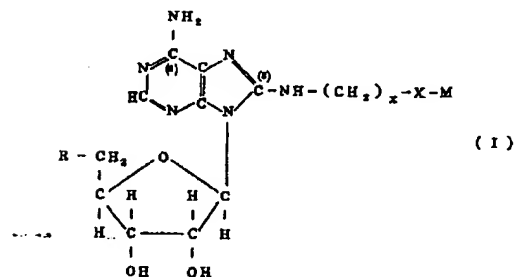


〔式中、 x は2乃至20、特に6乃至12、

X は、当該基に対する選択的親和力を有する化学薬
品又は免疫学薬品との結合反応が可能な基のうちか
ら選択された基 M との結合を確保する基である〕

で示されるリンクを介して行なわれるのが有利である。前記リ
ンクの基 CH_2 は基 CO 又は NH によつて部分置換され得る。
但し、これらの置換基については勿論同じ基同士が互いに隣接
してはならない。

例えば、ATPのアデニン基の8位が修飾される場合、得ら
れる被修飾リボヌクレオチドは（リンクが $-NH-(CH_2)_x-X-$
タイプの場合）、式



で示され、式中の R はトリホスフェート基、 x 、 X 及び M は前
出と同義である。基 X が基 NH 又は CO から成るのが有利であ
る。

例えば予め8位に基 X を付加したATPから式Iの修飾体を
製造するためには、適当な条件下で前記ATPを式
 $H_2N-(CH_2)_x-X-Y$ の化合物と反応させる。基 Y は次に前
記基 M で置換される。この置換に特に、分子 MZ との縮合反応
によつて行なわれ、該反応中に、式Iの縮合生成物が形成され
同時に分子 $Y-Z$ が遊離される。

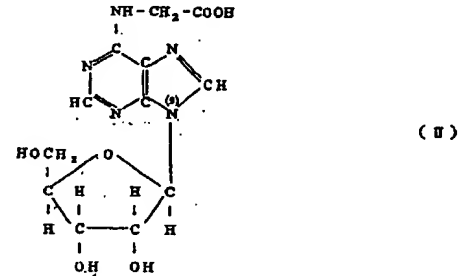
基 X が NH のとき Y は好ましくは水素である。 X が CO のと

きYは好ましくはヒドロキシルである。Zは、前記縮合反応でMから離脱され得るいかなる基でもよく、例えば所望基の供与体たる化学分子が1-フルオロ-2,4-ジニトロ-~~2,4~~-ベンゼンのときはフル酸であり、ペプチドのときはヒドロキシル又は水素である。後者の場合、ペプチドを前記リングの末端に結合するKは、基XYが基NH₂又はCOOHから成るときは結合反応を用いる。この反応はタンパク化学に於いて従来から使用されており、結合すべき別々の2つのペプチドエレメントの各々に担持されたカルボキシル基とアミン基との間で生起する。結合反応は例えば、ジシクロヘキシル-カルボジイドの如き縮合剤の存在中での縮合、又は、2つのペプチドエレメントの1つに担持されたカルボキシル官能基に活性化エステルを予め形成した後の縮合によつて行なわれる。

ATPのアデニン環の8位が前記の如き修飾基を含む環と結合し得る唯一つの場所でないことは明らかである。例えばアデニン環の6位の炭素により担持された水素原子の1つを修飾基を有する環で置換することも可能である。又は、例えば、1位の塩基が介入する第4級塩を予め形成し得るヨード酢酸又は等価のヨード化有機酸とATPとを反応させ、次に弱塩基性pH特にpH 8の塩基性媒体中で十分な時間例えば72時間に

亘り前記塩を35℃に加熱して置換生成物に変換することも可能である。この置換生成物は、~~修飾基の水素原子の1つがアデニン環の6位の炭素に結合したものである。~~
^{NH₂基の水素原子の1つが置換された}
(この反応はDimroth転位なる指称で知られている。)

前記の結果(ヨード化有機酸がヨード酢酸からなるとき)以下の式IIの化合物が得られる。



この化合物は次に、既出の式H₂N-(CH₂)_x-X-Yの化合物との反応によつて変換される。反応条件としては、式IIの化合物中のカルボキシル基に最初に含まれているカルボキシル基と化合物H₂N-(CH₂)_x-X-Yのアミノ官能基に最初から所属するイミノ基との化学結合が可能であるような条件が用いら

れる。化合物H₂N-(CH₂)_x-X-Y自体は前記条件下で式MZの化合物と結合され得る。

勿論、以上の記載は余て、前記の如く親和性分子に対応する修飾基のうちから選択された1つの修飾基をATPに結合するための特定の調整方法を説明するものである。

同様の方法でGTPの誘導体が製造され得る。この場合、前記の修飾化学基は同様の条件下でGTPのグアニン基の2位好ましくは8位に結合される。通常は同じ反応メカニズムが適用できる。

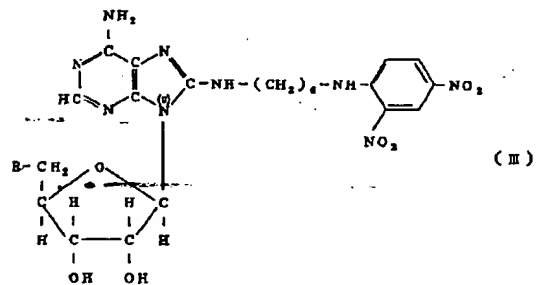
同様に、前記条件に応じた化学基によつて修飾されたUTP又はCTPも前記の好ましい用途に使用され得る。但し、これらの場合Kは、P. R. LANGER等の論文(Proc. Natl. Acad. Sci. 米国、78巻、11号、6633-6637 ページ、1981年11月)に記載の全く別の方法が使用される。

本発明の別の特徴は、本発明の好ましい実施例の記載より明らかにされるであろう。

8-[(-N-(ジニトロフェニル)-アミノ-ヘキシル)-アミノ]アデノシン-5'-トリホスフェートの製造

8-(アミノヘキシル)-アミノアデノシン-5'-トリホスフェートとフルオロ-1-ジニトロ-2,4-ベンゼンとを、

10/1容置比の水-エタノール混合物、pH 8.8、温度40℃、中でマグネシウム塩特に塩化マグネシウムを存在させて反応させる。次式の最終反応生成物が得られる。



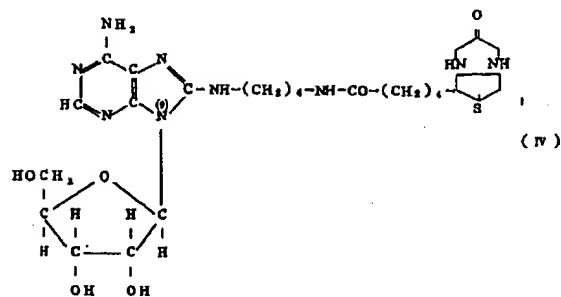
式IIIの誘導体を以後ATP-DNPと指称する。この誘導体は、DEAEセルロースへのリボスクレオチドの固定と0.2NのLiCl、pH 5.5から0.5NのLiCl、pH 2までの勾配による析出とSEPHADEX G50タイプのモレキュラーサイズによる濾過を含む精製処理後に回収される。反応収率は52%である。収集した成分を夫々280及び360nmの波長の放射線吸収分光測光法によつて分析する。前記の2つの波長領域での光学濃度比(D_{0.280}/D_{0.360})が4に等しい成分を集

める。該面分に含まれた生成物は1モルのDNPが1モルのATPに結合したものである。更に該面分は薄層クロマトグラフィ系で1つの染色点しか生じない。該面分の生成物を固結乾燥する。

該生成物は、血清アルブミンのタイプの高分子キャリアに予め結合されたジニトロ-2,4-ベンゼンに対して予め形成された抗体によつて認識され得る特性を有する。この種の抗体はまた市販されてもいる。

8-(N-ビオチニル-アミノヘキシル)-アミノアデノシン-5'-トリホスフェートの製造

8-(3-アミノ)アリルウリジンからビオチニル-UTPを製造するとき使用されるLANOBER等により記載された条件下で、8-(アミノヘキシル)-アミノアデノシン-5'-トリホスフェートとビオチニル-N-ヒドロキシ-スクニイミドエステルとを融合する。これにより次式の化合物を得る。



末端が被修飾リボヌクレオチドで標識されたDNAの製造

600 μ molのATP-DNPと500塩基対を含む10 μ gのDNA断片とを、30ユニットのDNA-ターミナルトランスフェラーゼを存在させ緩衝溶液中で37℃で24時間反応させる。緩衝溶液は以下の組成を有する(最終量200 μ l)：

カコシル酸カリウム：100 mM

ウシ血清アルブミン：1 mg/ml

ジチオトレイトール：1 mM

塩化コバルト：1 mM

登録商標SEPHADEX G50なる市販のモレキュラーン

-Pのカラムに溶液を通して、末端にATP-DNP基を保持するDNAを精製する。

該面分の一箇をセルロースフィルタに付着させる。フィルタを乾燥させウサギの抗DNP抗体溶液と接触させる。結合しなかつた抗体を洗い落とす。次に、フィルタをペルオキシダーゼに結合されたウサギの抗体溶液と接触させる。結合しなかつた余剰の抗体を洗い落とし、ペルオキシダーゼ用基質の溶液でフィルタに結合した抗体の存在を検出する。該溶液は、

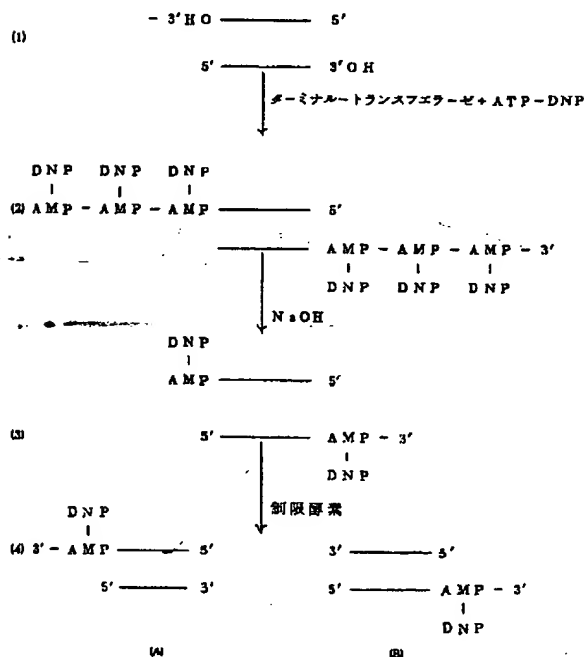
- 酸素添加水：10 μ lのH₂O₂(110倍希)
- 酢酸カリウム：9.5 ml, 0.05 M, pH 5.1、
- カルバザール：2 ml (0.5 mlのN-N'-ジメチルホルムアミド)

これにより、尸過物に於いてウサギの抗抗体の存在が赤褐色沈物の形成によつて検出される。

方法の感度は、極めて微量のDNA特異性380,10⁻⁶ピコモルのDNAを検出し得る程である。

DNAの構成デオキシヌクレオチドの配列を解析するための本発明の被修飾DNAの適用

所定の二本鎖DNAの内部に含まれるヌクレオチド配列の解析方法の最初のステップは以下の如く要約される。



出発DNA(1)は、各鎖の末端に3'及び5'の符号を矢々有する2本の平行鎖で示される。

DNA-ターミナルトランスフェラーゼの存在中でATP-DNPと反応させると図に示す被修飾DNA断片が得られる。該断片の3'末端にAMP-DNPオリゴマーが結合している。(図示の例では各オリゴマーは基本単位AMP-DNPを3個有する。AMPは、オリゴマー化によつてATP-DMPモノマー当り2つのホスフェート基が除去されたATP-DMPの誘導元素である)。

前記の如く修飾されたDNAを40℃、1Mの水酸化ナトリウム溶液でアルカリ加水分解する。これにより、ターミナル末端の各々に唯一つの被修飾リボヌクレオチドを含む被修飾DNAをモノユースレーション法により再度回収し得る。

例えばMAXAM & GILBERT に記載の条件下で制限酵素を作用させ、(4)に符号A、Bで示される2つの断片を得る。(4)、(3)、(4)の処理順序を任意に変更し得ることは明らかである。

例えば断片Bの単離精製後、複数のロットに分け、夫々のロットに対しMAXAM & GILBERT に記載の条件下で該記載の如き種々の差異開裂反応を生じさせる。これらの選択的開裂反応後に得られた生成物を同じ著者等により記載の条件下でアクリルアミドゲル電気泳動で処理し、標識末端を各々有する種々のDNA断片をサイズに基いて種々のバンドに分離する。

本発明によれば、標識された種々の断片を次に、例えばゲル中で10 slot に検出するべく、前記条件下で抗体溶液と接触させる。また、セルロースフィルタ又は同様の担体をゲルに附着させ、別々の流動バンドの少くとも一部を該フィルタに移し、例えば前記条件下で、種々の断片即ちバンドをフィルタ自体の上で検出することも可能である。

極めて感度の良い本発明の方法によれば、分画バンドをゲル中又はフィルタ上で直接可視化して検出を行なうことができるので、従来必要とされた超薄片ゲルプレートを使用しなくてもよい。

修飾されたりリボヌクレオチドが新規なものであるときは、本発明は被修飾リボヌクレオチド自体を勿論包含する。このようなケースとしては特に、前記条件下で修飾されたりリボヌクレオチドがATPから誘導されている場合がある。

勿論前記から明らかな如く本発明は特定例として示された記載の用途及び実施態様に限定されない。逆にその変形の全てを包含する。

国際調査報告

International Application No. PCT/FR82/00223

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (of parent classification system; specify, if any, the subclass)	
According to International Patent Classification (IPC) or in both National Classification and IPC IPC ³ : C07H 21/00; C12N 15/00; G01N 13/50	
2. FIELD OF SEARCH	
Classification System	Classification System
IPC ³	C07H 21/00; C12N 15/00
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁾	
Category ²⁾	Character of Document ³⁾ (with indication, where appropriate, of the document category ¹⁾)
X	Chemical Abstracts, vol. 56, No. 7, February 15, 1982 (Columbus, Ohio, US), P.R. Langer et al.: "Enzymic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes", see page 207, column 2, ref.: 47771s, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1981, 78(11), 6633-7
Y	DE, A, 2618511 (MIL85), 04 November 1976, see pages 34-113
Y	DE, A, 2618419 (MIL85), 04 November 1976, see pages 34-62
Y	US, A, 4255566 (R.J. CARRICO et al.), 10 March 1981, see column 2, lines 50-70; columns 3, 4
4. CERTIFICATION	
Date of the Actual Completion of the International Search ⁴⁾	Date of Filing of the International Search Report ⁵⁾
16 March 1983 (16.03.83)	31 March 1983 (31.03.83)
International Searching Authority ⁶⁾	Signature of Authorised Officer ⁷⁾
European Patent Office	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) December 1982